

| | |
|-------------|---|
| Title | B-10 霊長類,赤及び緑感受性視物質の構造・機能相関解析 |
| Author(s) | 神取, 秀樹; 片山, 耕大; 川田, 大輝; 大橋, 知明 |
| Citation | 霊長類研究所年報 (2013), 43: 95-96 |
| Issue Date | 2013-11-13 |
| URL | http://hdl.handle.net/2433/179897 |
| Right | |
| Type | Departmental Bulletin Paper |
| Textversion | publisher |

ストレスによってその形態を変化させたと考えられる。従来、筋力は筋の重量、断面などによって推定されてきたが、それらは筋の構造によって必ずしも確かなパラメータとは言えない。そこで、骨が力学的に最適な形状となっているのであれば、逆に、骨の形状から骨に加えられている力学的ストレス(筋力)を推定できるはずであると考えた。そこで、さまざまな位置的行動パターンを示すヒト以外の霊長類における大腿骨近位部の三次元的配置と諸筋の三次元的走行をもとに骨に加えられる筋力を求め位置的行動への反映を明らかにすることを目的とした。本年は、その第一段階として、マカク、テナガザル、チンパンジーの骨標本による形状の把握、液浸標本 MR 撮影による筋走行、位置関係の把握を行った。今後、本手法を用いて他の霊長類標本の観察を行う予定である。

B-7 霊長類の光感覚システムに関わるタンパク質の解析

小島大輔, 森卓, 鳥居雅樹(東京大・院理・生物化学) 所内対応者: 今井啓雄

脊椎動物において、視物質とは似て非なる光受容蛋白質(非視覚型オプシン)が数多く同定されている。私共は最近、非視覚型オプシンの一つ OPN5 がマウスの網膜高次ニューロンや網膜外組織(脳や外耳)に発現すること、さらにマウスやヒトの OPN5 が UV 感受性の光受容蛋白質であることを見出した [Kojima et al. (2011) PLoS ONE, 6, e26388]。このことから、従来 UV 感覚がないとされていた霊長類にも、UV 感受性の光シグナル経路が存在することが示唆された。そこで本研究では、OPN5 を介した光受容が霊長類においてどのような生理的役割を担うのかを推定するため、霊長類における OPN5 の発現部位の同定を試みている。本年度は、サル個体の組織(眼球・外耳など)より RNA を抽出し、各組織の cDNA 試料を作成した。これらの cDNA に対して、サル OPN5 遺伝子に特異的なプライマーを用いた定量的 PCR を行なった。その結果、マウスと同様に耳介において OPN5 遺伝子発現を検出した。今後は、他の組織(脳など)も対象に入れて OPN5 遺伝子発現を調べるとともに、サル OPN5 抗体を作製してタンパク質レベルでの解析を進めたい。

B-8 群馬県における猿害の実態と遺伝的多様性について

姉崎智子(群馬自然史博物館) 所内対応者: 今井啓雄

東西の動物群が交錯する群馬県において、ニホンザルの生息状況および猿害の実態と遺伝的多様性について明らかにし、猿害の削減に役立てることを目的に研究を実施した。2012 年度に得られた 13 体のニホンザルを解剖し、食性、繁殖状況等を調べた。2008 年度からの分析結果 40 頭分とあわせると、本県のニホンザルの体格は大きく、栄養状態は良好であり、体型指数は 74.9~148.6 であった。食性では、13 体で胃内容物が確認され、分析した結果、トウモロコシ、カボチャ、キュウリ、ニンジン、ブドウが同定された。農作物を多く利用していることが、良好な栄養状態に寄与しているものと推定された。これらの成果については、県野生動物保護管理計画検討会の基礎資料として活用された。また、2008~2012 年度にかけて得られたニホンザルのうち、27 体について研究所遺伝子情報分野の苦味受容体遺伝子等の分析に供した。集団内の遺伝的多様性を示す尺度である塩基多様度を他の地域と比較したところ、遺伝的多様性が低いと考えられている東日本と共通の特徴を持つ可能性が指摘されている。

B-9 霊長類におけるエピゲノム進化の解明

一柳健司, 佐々木裕之, 福田溪(九州大・生医研) 所内対応者: 郷康広

我々は霊長類におけるゲノム進化とエピゲノム進化の関係を解明するため、ヒトとチンパンジー(霊長類研究所の飼育個体)の末梢白血球の DNA メチル化比較研究を行ってきた。これまでに、21、22 番染色体において 16 カ所のメチル化差異領域を同定した。さらに、これらの領域のメチル化状態をゴリラやオランウータンの DNA でも調べることで、CTCF タンパク質の結合配列の出現・消失によって、DNA メチル化状態が変化し、転写状態に影響を与えていることを世界で初めて示した。

本年度は大規模シーケンサーを用いて、ヒトとチンパンジーのメチル化差をゲノムワイドに解析し(エピゲノム解析)、メチル化変化領域には CTCF と ZNF217 の結合配列モチーフが濃縮されていることを明らかにした。さらに、ナイーブ T 細胞の反応応答性がヒトとチンパンジーでは異なることに注目し、両種の末梢血からナイーブ T 細胞および活性化 T 細胞をセルソーティングによって精製した。現在、これらの細胞のエピゲノム解析とトランスクリプトーム解析を進めている。

B-10 霊長類赤及び緑感受性視物質の構造・機能相関解析

神取秀樹, 片山耕大, 川田大輝, 大橋知明(名工大・院工) 所内対応者: 今井啓雄

ヒトを含む霊長類の網膜に存在する 3 種類(赤・緑・青)の色覚視物質は試料調製が困難なため、X 線結晶構造解析を含む構造生物学的解析は過去に例がなく、我々の色認識メカニズムは謎のままであった。そのような現状下、我々は培養細胞を用いて作製した霊長類の赤・緑感受性視物質に対する高精度の赤外分光測定による構造解析を行ってきた。これまでに 2 報の論文を発表しており、平成 24 年度は部位特異的な変異タンパク質に対する実験に挑戦した。これにより、赤・緑視物質間で違いが観測されていた赤外振動バンドを帰属し、両者の構造の違いがどのアミノ酸や水分子に由来するのか明らかにできると期待する。すでに違いを生み出すアミノ酸の一つを特定することにも成功している。また、レチナール分子の同位体標識を駆使することで、レチナール分子の振動バンドを同定することにも成功しており、野生型のデータだけでは不可能であった構造基盤に立脚した詳細な波長制御機構の議論が

可能になった。現在はさらなるアミノ酸の変異体実験を進行中であり、並行して赤・緑感受性視物質間におけるアミノ酸及び水分子によって形成される水素結合ネットワークの違いが波長制御に及ぼす影響について論文を作成中である。

霊長類色覚視物質の構造解析は、今もって達成できているグループは世界中で我々だけであるが、本共同研究プロジェクト始動から6年目を迎える段階にきてようやく、構造基盤に立脚した詳細な赤・緑の波長制御機構が議論できるようになった。平成25年度は青視物質の構造解析に挑戦する予定であり、今後も色覚視物質の構造解析の成果を世界に発信できる点を踏まえ、支援いただいている霊長研に改めて謝意を表したい。

B-11 遺伝子分析を利用した飼育下のワオキツネザルの父系判定の研究

佐藤百恵, 中尾汐莉, 高木幸恵, 清水大輔((財)日本モンキーセンター) 所内対応者: 川本芳

マダガスカルのパレンティ保護区のワオキツネザル調査で父子判定に利用されているマイクロサテライト DNA マーカーのうち、Lc5、Lc6、Lc8、Lc9、47HDZ236、69HDZ208、69HDZ091、69HDZ03 の8遺伝子座について日本モンキーセンター(以下JMC)で飼育するワオキツネザルの遺伝的多型を検索した。溶解緩衝液入りチューブに体毛を採取し、そこから Kawamoto et al. (2013)の方法に従って抽出したDNAを分析試料とした。プライマーによる増幅がみられるか、現存する若齢個体の父親になる可能性があるすべての性成熟雄14個体と、試験的に雌2個体で実験したところ、いずれのマーカーでも顕著な遺伝子多型がみられた。

結果の再現性が十分に確認できていない Lc9 と 47HDZ236 を除き、6種類のマーカーの結果からソフトウェア GenAlEx6.5 で計算した結果、個体判別確率は0.9947、一般父権否定確率は0.9871となった。この6種類のマーカーを利用すれば、JMC内で産まれたワオキツネザルの父親を高い確率で判定することができることがわかった。来年度の研究では、実験条件と標識特性が確認できたこれらのマーカーを利用し、母子の遺伝子型を調べて父親を特定しコロニーの家系図を作成する予定である。

B-12 霊長類の各種の組織の加齢変化

東超(奈良県医大・医) 所内対応者: 大石高生

加齢に伴う喉頭の甲状軟骨のミネラル蓄積の特徴を明らかにするために、サルの甲状軟骨の元素含量の加齢変化を調べた。用いたサルはアカゲザル10頭、ニホンザル1頭、カニクイザル3頭、年齢は1月から27歳、雄雌は雄9頭と雌5頭である。サルより甲状軟骨を採取し、硝酸と過塩素酸を加えて、加熱して灰化し、元素含量を高周波プラズマ発光分析装置(ICPS-7510、島津製)で分析し、次のような結果が得られた。

- ①サルの甲状軟骨のカルシウム平均含量は30.9 mg/gで、カルシウム蓄積が生じやすい軟骨であることが分かった。
- ②サルの甲状軟骨のカルシウム、リン平均含量は年齢とともに有意に増加した。
- ③サルの甲状軟骨のカルシウム含量は7歳以上になると顕著に増加した。この結果からサルの甲状軟骨において一定年齢を超えると石灰化が始まることが分かった。
- ④カルシウム、リン、マグネシウム元素間に非常に高い有意相関が認められ、カルシウム、リン、マグネシウムが甲状軟骨に同時に蓄積されることを示している。

B-13 サル脊髄由来間質系幹細胞の培養とその移植によるラット脊髄損傷修復効果の検討

古川昭栄, 福光秀文, 宗宮仁美(岐阜薬大・分子生物) 所内対応者: 大石高生

ラット脊髄損傷部位に FGF-2 を注入すると脊髄に固有の間葉系細胞(FGF-2誘導性フィブロネクチン陽性細胞: FIF)が増殖し運動機能が改善される。又、培養下で増殖させた FIF 細胞の移植によっても同等の効果が認められる。そこで本研究では、FIF 様細胞をサルの脊髄組織から培養し、これをラット脊髄損傷モデルに移植してその効果を評価することを計画した。ラットの場合、0.3-1.0 mm厚に薄切した脊髄実質部をコラーゲンコート皿に静置し、FGF-2 と血清を含む培養液で培養すると組織周囲から無数の細胞が遊走するのでこれを増殖させる方法が確立している。サルの脊髄について同様に試みたところ、初期段階での細胞の遊走や増殖性が悪く、最終的に移植に必要な細胞数が確保するのが困難であった。そこで、ヒト間質系幹細胞を培養した調整培養液(conditioned medium)を用いたところ効果がありこの点が改善されたように思われる。現在、同細胞の培養を継続中であり、ラット脊髄損傷モデルに移植して効果を検討する。

B-14 マカク種における仙骨湾曲と尾長との相関

東島沙弥佳(京都大・院・理) 所内対応者: 濱田穰

霊長類における顕著な尾の形態変異は、系統進化と適応に関わる重要な指標であるが、詳細な研究は少ない。筆者はこれまで尾長変異が仙尾部骨格形態に与える影響に着目し、旧世界ザルにおいて尾長に関連する仙骨特徴の解明と尾長推定法の開発を行ってきた。結果、短尾の狭鼻猿については信頼性の高い推定式が得られたが、これは長尾、超短尾種で大きな推定誤差を生じ、そうした種では、従来の直線計測では評価できなかった仙骨形態が尾長と強く関与している可能性が示唆された。そこで本研究では、仙骨正中矢状面形態に着目し、尾長の異なる狭鼻猿種において尾長との関連性を調査した。中～超短尾マカク(*M. cyclopis*, *M. mulatta*, *M. fuscata*, *M. assamensis*, *M. nemestrina*, *M. arctoides*)成熟個体(歯列完全萌出以後)の仙骨を用い、三次元的幾何学的形態分析を行った結果、短尾